

几丁质降解放线菌对棉花枯、黄萎菌的作用^{*}

宗兆锋¹, 卫亚红², 高利¹, 薛洋³, 杨之为¹

(1 西北农林科技大学 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨陵 712100; 3 北京市大兴区林业局 林保站, 北京 102600)

[摘要] 对从土壤中分离到的58株放线菌进行了皿内拮抗试验及利用几丁质能力测定,在此基础上筛选出了F104、F105 2株产几丁质酶的菌株,并测定了其对于棉花枯、黄萎菌的离体和活体抑制作用。皿内观察发现,F104和F105均可寄生于棉花黄萎菌,F105还可寄生于棉花枯萎菌。平皿扩散试验结果发现,F104和F105的培养滤液无论经高温处理与否,均能使棉花黄萎菌呈现畸形菌丝,而经高温处理的F104还可使棉花枯萎菌表现为畸形菌丝。抑制靶标致病菌寄主活体定殖作用的研究结果表明,F104和F105处理均表现出不同程度的超前接种防治黄萎病的作用,超前接种F105的间隔期与棉苗中枯萎菌的检出率呈负相关。

[关键词] 棉花枯萎菌; 棉花黄萎菌; 几丁质降解菌; 病害生物防治

[中图分类号] S435.621.2; S476+.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2003)06-0063-03

近年来,许多植病生防工作者从多种微生物(细菌、放线菌和真菌)中筛选出分泌高活性几丁质酶的菌株,经培养作为生防制剂直接施于植株表面或根围附近^[1-6]。本研究对从土壤中分离的58株放线菌进行了皿内拮抗试验及利用几丁质能力测定,从中筛选出了2株产几丁质酶的放线菌,并测定了其对于棉花枯、黄萎菌的离体和活体抑制作用。

1 材料和方法

1.1 放线菌的分离筛选

采用稀释平板法分离土壤中的放线菌,以腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)和尖镰孢菌(*F. oxysporum*)为靶标菌,用琼脂块法测定供试菌株对靶标菌的皿内拮抗性;将分离纯化所得放线菌菌株接种于几丁质培养基^[7],筛选在培养基上能够生长、菌落周围有透明圈的菌株。

1.2 病原菌的皿内寄生能力测定

将靶标致病菌棉花枯萎菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、棉花黄萎菌(*Verticillium dahliae*)均匀接种于适合生长的培养基平板上,待菌丝布满皿后,把入选的放线菌均匀喷布于平板上继续培养,定期观察放线菌的寄生状况,并进行镜检观察。

1.3 平皿扩散试验

于PDA平板上均匀涂抹接种靶标病原真菌,

随之打5个孔,四周孔中分别注入高温处理的和未处理的F104和F105,中心孔注入无菌培养液作为CK。培养3d后观察记载抑菌情况,并进行镜检观察,每处理重复3次。

1.4 抑制靶标致病菌寄主活体定殖作用

靶标菌与生防菌用3种不同接种时间处理棉花种子。处理1:用放线菌处理种子后催芽,待种子露白后用致病菌进行挑战接种;处理2:用放线菌处理种子后催芽、播种,出苗2d后用致病菌进行挑战接种;处理3:用致病菌处理种子后催芽、播种,出苗2d后接入放线菌。沙培10d后,在棉苗茎组织上、中、下3个不同部位分段截取5mm长的组织块,表面消毒后在选择性培养基上培养,检测生防菌对靶标致病菌在寄主幼苗体内定殖能力的抑制作用^[11]。

2 结果与分析

2.1 皿内抑菌作用

对58株放线菌进行皿内抑菌作用的测定(表1)发现,对腐皮镰孢菌拮抗作用显著的有6株菌株,占总菌株数的10.3%;对尖镰孢菌拮抗作用表现较强的有12株,占总菌株数的20.7%。对2种镰孢菌均表现出较强拮抗作用的有F099、F104和F131 3个菌株。

^{*} [收稿日期] 2003-04-08

[基金项目] 农业部农业结构调整重大技术研究项目(2002-08-03A);西北农林科技大学重点科研项目

[作者简介] 宗兆锋(1956-),男,陕西泾阳人,教授,主要从事植物病害生物防治研究。

表 1 放线菌抑菌作用测定结果

Table 1 Antagonistic effect of actinomycetes on *Fusarium solani* and *F. oxysporum* spp.

拮抗反应			拮抗反应			拮抗反应		
菌株	Antagonistic effects		菌株	Antagonistic effects		菌株	Antagonistic effects	
Isolates	腐皮镰孢菌	尖镰孢菌	Isolates	腐皮镰孢菌	尖镰孢菌	Isolates	腐皮镰孢菌	尖镰孢菌
	<i>F. s</i>	<i>F. o</i>		<i>F. s</i>	<i>F. o</i>		<i>F. s</i>	<i>F. o</i>
F077	-	-	F097	++	-	F117	-	-
F078	+	++	F098	++	-	F118	-	-
F079	-	-	F099	++++	+++	F119	-	++
F080	-	+++	F100	+	++	F120	+	+
F081	-	-	F101	+	++	F121	+	-
F082	-	-	F102	+	+	F122	+	+
F083	-	-	F103	+	-	F123	++	-
F084	+	+++	F104	++++	++++	F124	-	+++
F085	++	++	F105	++	+	F125	-	-
F086	-	+++	F106	++	+++	F126	+	+
F087	-	+	F107	+	++	F127	+	+
F088	+	-	F108	++	-	F128	++	+++
F089	+	++++	F109	+	+	F129	-	-
F090	+	-	F110	+++	++	F130	+	+
F091	++	-	F111	++	+	F131	+++	+++
F092	-	-	F112	++	+++	F132	-	+
F093	+	-	F113	+++	-	F133	-	+
F094	-	-	F114	-	-	F134	-	-
F095	+	-	F115	++	+++			
F096	+	-	F116	-	-			

注：“-”表示不能利用几丁质；“+，++，+++，++++”分别表示利用几丁质的能力。
Note:“-” Indicates chitin can not be utilized; “+，++，+++，++++” Indicates the ability to utilize chitin

2.2 分泌几丁质酶能力测定

由于大量离体和活体试验缺乏相关性,对于一些离体条件下通过皿内抑菌试验确定的不产生抑菌物质或抑菌作用弱的菌株,不能轻易淘汰。本试验将菌株能否产生几丁质酶作为另一个分析指标,对分离获得的 58 株土壤放线菌接种几丁质平板,复筛到 2 株产几丁质酶的菌株。皿内抑菌试验中作用较显著的 F099, F104, F131 菌株中,仅 F104 产生几丁质酶,并且强度最强。而另 1 株产生几丁质酶的放线菌 F105 的皿内抑菌作用不显著,两者没有相关性。

2.3 对病原菌的皿内寄生能力

在供试的 2 个靶标病原真菌中,通过皿内直接观察发现, F105 可以寄生于棉花枯萎菌上, F104 和 F105 均可寄生于棉花黄萎菌。显微镜检和扫描电镜观察发现,将生防菌接种于棉花黄萎菌和枯萎菌,病原菌均产生大量的小菌核或厚垣孢子,随时间延长,小菌核或厚垣孢子均出现不同程度的消解。说明接种生防菌后给靶标菌营造了一个极为不利的生存环境,导致病原菌产生休眠结构来抵抗不良生境,休眠结构最终还是趋于消解。

2.4 平板扩散试验

F104 和 F105 2 种放线菌分别对 2 种致病菌的

平皿扩散试验结果显示,无论哪种放线菌,无论经高温处理与否,均会使棉花黄萎菌呈现出畸形菌丝,未经高温处理的 F104 可以引起菌丝溶解;经高温处理的 F104 可使棉花枯萎菌表现为畸形菌丝。经处理的生防菌中厚垣孢子少而稀,未经处理的厚垣孢子多而密。

2.5 抑制靶标致病菌寄主活体定殖作用

用 F104, F105 处理后,病原菌的检出率均较对照低(表 2, 表 3),表明 2 种放线菌均可显著抑制棉花枯萎菌和黄萎菌在棉苗体内的定殖。经 F104, F105 处理后,均表现出了不同程度的超前接种防治黄萎病的作用, F105 处理后棉苗体内黄萎菌的检出率很低,而 F104 对棉花黄萎菌定殖作用的影响低于 F105(表 2);超前接种 F105 的间隔期与棉苗中枯萎菌的检出率呈负相关。F104 处理对枯萎菌的抑制作用比 F105 强(表 3),而对黄萎菌的作用正好相反,说明 2 株生防菌对不同靶标菌的作用机理不同。

从表 2 还可以看出,棉苗中枯萎菌的检出率以基段最多,其次为顶段,中段反而最低,其机理还有待于进一步研究探索。

表 2 棉苗中棉花枯萎菌的检出率

Table 2 Distribution of <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> in cotton seedling							%
处理 Treatments	F104			F105			
	基段 Radicle	中段 Middle	顶段 Tip	基段 Radicle	中段 Middle	顶段 Tip	
空白对照 CK	28.6	14.3	0	28.6	14.3	0	
致病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	69.2	14.3	35.7	69.2	14.3	35.7	
生防菌 <i>Actinomyces</i> F104 or F105	0	0	0	0	0	0	
处理 1 Treatment 1	23.1	15.4	20.0	50.0	0	6.1	
处理 2 Treatment 2	0	0	0	31.6	0	0	
处理 3 Treatment 3	0	0	0	63.6	9.1	18.2	

表 3 棉苗中棉花黄萎菌的检出率

Table 2 Distribution of <i>Verticillium dahliae</i> in cotton seedling							%
处理 Treatment	F104			F105			
	基段 Radicle	中段 Middle	顶段 Tip	基段 Radicle	中段 Middle	顶段 Tip	
空白对照 CK	28.6	14.3	0	28.6	14.3	0	
致病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	100.0	50.0	12.5	100.0	50.0	12.5	
生防菌 <i>Actinomyces</i> F104 or F105	0	0	0	0	0	0	
处理 1 Treatment 1	44.4	22.2	12.5	20.0	0	0	
处理 2 Treatment 2	36.3	20.8	0	0	0	0	
处理 3 Treatment 3	81.2	0	0	20.0	0	0	

[参考文献]

[1] 宗兆锋, 钮绪燕, 李君彦, 等. 西瓜枯萎病拮抗菌的筛选研究[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(2): 60- 64

[2] 檀建新, 陈忠义, 张 杰, 等. 产几丁质酶菌的分离鉴定及其抑菌作用的初步研究[J]. 植物保护, 2001, 27(2): 1- 3

[3] 乔宏萍, 宗兆锋. 重寄生菌 F46 和 PR 对苹果采后病害 3 种致病菌的控制作用[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 47- 49

[4] 宗兆锋, 乔宏萍, 何杞真. 2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用[J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 1- 4

[5] Pisano M A, Sommer M J, Taras L. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology Journal, 1992, 36(4): 553- 555

[6] Larena I, Melgarejo P. Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum* [J]. Biol Control, 1996, 6(3): 361- 367

[7] Dhingra O D, Sinclair J B. Basic plant pathology methods[M]. Florida: CRC Press, 1985: 289

Effects of chitinolytic actinomycetes on *Fusarium oxysporum*
f. sp. *vasinfectum* and *Verticillium dahliae*

ZONG Zhao-feng¹, WEI Ya-hong², GAO Li¹, XUE Yang³, YANG Zhi-wei¹

(1 Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, College of Plant Protection;

2 College of Resources and Environmental Science, Northwest Sci-Tech University

of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Department of Forestry in Daxing Section, Beijing 102600, China)

Abstract: The antagonistic effects and the chitinolytic ability of the 58 isolates of the actinomycetes were tested *in vitro* and 2 selected isolates F104 and F105 with chitinolytic ability were screened for suppression of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *V. dahliae*. The mycelium of *V. dahliae* growth malformed in PDA diffusion test with the culture filtration of isolates F104 and F105. An effective control result to *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *V. dahliae* were obtained when pre-inoculation of cotton seedling with isolates F104 and F105 in greenhouse.

Key words: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; *Verticillium dahliae*; chitinolytic actinomycetes; biological control